

Abstract

During primary infection, the prevalent human pathogen herpes simplex virus 1 (HSV-1) targets the human skin, mucosa, and cornea as initial entry portals. How the virus overcomes epithelial barriers to reach cellular receptors, and which cellular mechanisms it exploits for uptake into target cells to initiate successful infection is not yet fully understood.

In the first part of this study, the focus was on the cellular determinants contributing to the entry of HSV-1 in skin cells. In general, HSV-1 can use a variety of cellular pathways. Previous studies with skin cells suggested that HSV-1 internalization depends on dynamin, a large GTPase that controls several endocytic pathways. To gain insights into the underlying mechanism of dynamin involvement, HSV-1 entry in dynamin 1 and 2 double knockout mouse embryonic fibroblasts was investigated. Surprisingly, infection experiments revealed that HSV-1 entered dynamin-deficient and dynamin-expressing cells with comparable efficiency suggesting that alternative pathways present upon dynamin depletion were exploited for viral internalization.

The second part of this study concentrated on the tissue invasion of HSV-1. Human skin is normally well protected from pathogens as the epithelium forms effective barriers. To understand how susceptible the human epidermis is and whether wounding facilitates viral invasion, an *ex vivo* infection assay with human skin was established. As expected, viral invasion from apical surfaces in intact human skin was prevented. Only at the cutting edges of skin samples with integrity loss, invasion of HSV-1 in the epidermis was observed. Upon *ex vivo* infection of epidermal sheets after removal of the dermis, HSV-1 efficiently invaded the basal epidermal layer and gained access to suprabasal layers supporting a high susceptibility of human epidermal cells. Surprisingly, mechanical wounding of skin samples with microneedles did not allow HSV-1 infection *per se*. Only dermal injuries that led to HSV-1 exposure of basal keratinocytes allowed successful infection.

To explore the impact of functional epidermal barriers, HSV-1 invasion in skin was studied under pathological conditions. A prominent example of successful HSV-1 invasion in human skin is *eczema herpeticum*, a disseminated infection and severe complication of atopic dermatitis caused by primary infection with HSV-1. Whether the higher susceptibility to HSV-1 is due to the barrier impairment and/or chronic inflammation in lesional atopic dermatitis skin is still speculative. *Ex vivo* infection studies revealed that HSV-1 indeed invaded lesional skin from the apical surface. Immunostainings showed a redistribution of various barrier components and supported facilitated HSV-1 infection due to impaired epidermal barriers. To demonstrate a direct correlation between individual barrier defects and enhanced viral invasion, human 3D epidermal models were adopted. HSV-1 infection studies confirmed the important roles of the *stratum corneum* and the integrity of tight junctions in hindering HSV-1 entry in keratinocytes. Moreover, the 3D cultures provided a tool to introduce phenotypic

inflammation-induced hallmarks of atopic dermatitis. Intriguingly, HSV-1 infection in 3D epidermal models with an atopic dermatitis phenotype was not increased indicating that the inflammation-induced barrier defects alone are insufficient to allow viral invasion. Next to inflammation, the enhanced colonization of lesional skin of atopic dermatitis patients with *Staphylococcus aureus* might induce barrier defects. In this study, initial analyses addressed how *Staphylococcus aureus* could affect tight junctions which in turn might influence successful HSV-1 entry. First results support remodeling of tight junctions by *Staphylococcus aureus*, however, there was no obvious link to facilitated HSV-1 entry.

Zusammenfassung

Haut, Mukosa und Kornea sind die initialen Eintrittspforten für das Humanpathogen Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) während der primären Infektion. Offen ist bislang, wie das Virus die epithelialen Barrieren überwindet, um seine zellulären Rezeptoren zu erreichen und welche zellulären Mechanismen es für die Aufnahme in seine Zielzellen nutzt, um schließlich eine erfolgreiche Infektion zu initiieren.

Der Fokus des ersten Teils dieser Arbeit lag auf den zellulären Faktoren, die am HSV-1-Eintritt in Hautzellen beteiligt sind. Generell kann sich HSV-1 eine Vielzahl an zellulären Aufnahmewegen zunutze machen. Bisherige Studien mit Hautzellen zeigten, dass die HSV-1-Internalisierung von Dynamin, einer großen GTPase, welche unterschiedliche Endozytose-Wege kontrolliert, abhängig ist. Um den der Dynamin-Beteiligung zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen, wurde der HSV-1-Eintritt in murinen embryonalen Dynamin 1- und 2-Doppel-Knockout Fibroblasten untersucht. Infektionsexperimente zeigten überraschend, dass das Virus mit vergleichbarer Effizienz in die Dynamin-exprimierenden und -defizienten Zellen eindrang. Dies weist darauf hin, dass HSV-1 in der Abwesenheit von Dynamin auftretende alternative Aufnahmewege nutzen kann.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Invasion von HSV-1 in das humane Gewebe. Da das Epithel effektive Barrieren ausbildet, ist die Haut unter normalen Bedingungen sehr gut gegen Pathogene geschützt. Wie empfänglich die humane Epidermis gegenüber HSV-1-Infektionen ist und ob mechanische Verwundung der Haut die virale Invasion erlaubt, wurde mithilfe eines *ex vivo*-Infektionsmodells analysiert. Der Erwartung entsprechend konnte das Virus nicht in intakte Haut eindringen. Lediglich an Schnittstellen am Rand der Hautproben, wo es zuvor zu einem Verlust der Gewebe-Intaktheit gekommen war, wurden infizierte Zellen der Epidermis beobachtet. Wurde die Epidermis nach Entfernung der Dermis *ex vivo* infiziert, drang HSV-1 erfolgreich in die basale Schicht ein und erlangte sogar Zugang zu suprabasalen Zellen. Die humanen epidermalen Zellen waren folglich sehr empfänglich gegenüber HSV-1. Entgegen der Erwartung führte mechanische Verwundung von Hautproben mit einem Derma-Roller nicht *per se* zu einer Infektion, sondern nur, wenn eine starke Verletzung in der Dermis dem Virus die basalen Keratinozyten zugänglich machte.

Anschließend wurde die Bedeutung funktionaler epidermaler Barrieren auf die HSV-1-Invasion in Haut unter pathologischen Bedingungen untersucht. Ein bekanntes Beispiel für den erfolgreichen HSV-1-Eintritt in die humane Haut ist das *Ekzema herpeticum*. Dabei handelt es sich um eine durch eine primäre HSV-1-Infektion ausgelöste disseminierte Infektion und schwere Komplikation der atopischen Dermatitis. Darüber, ob die besondere Empfänglichkeit für HSV-1 auf den veränderten epidermalen Barrieren und/oder der chronischen Entzündung beruht, kann bisher nur spekuliert werden. *Ex vivo*-Infektionen zeigten in dieser Arbeit, dass eine HSV-1-Invasion über die apikale Oberfläche möglich war. Immunfärbungen wiesen

weiterhin auf eine Umverteilung von verschiedenen Barrierefaktoren hin und unterstützten somit die These, dass die verbesserte HSV-1-Infektion in den geschädigten epidermalen Barrieren begründet ist. Um eine direkte Korrelation zwischen einzelnen Barrieredefekten und der verbesserten Virus-Invasion herstellen zu können, wurden humane epidermale 3-D-Modelle verwendet. Infektionsstudien in den 3-D-Modellen bestätigten die bedeutende Rolle des *Stratum corneums* und der Intaktheit von Tight Junctions, da sie den HSV-1-Eintritt in Keratinozyten verhinderten. Des Weiteren boten die 3-D-Kulturen die Möglichkeit, entzündungsinduzierte Charakteristika der atopischen Dermatitis und deren Einfluss auf den HSV-1-Eintritt zu analysieren. Da jedoch keine verbesserte HSV-Invasion beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass die entzündungsinduzierten Barrieredefekte nicht ausreichend für einen Viruseintritt sind. Neben der Entzündung kann auch die Kolonisierung der Ekzemhaut mit *Staphylococcus aureus* Barrieredefekte hervorrufen. Daher wurden in dieser Arbeit initiale Untersuchungen bezüglich der Frage, wie *Staphylococcus aureus* Tight Junctions beeinflussen und dadurch wiederum den HSV-1-Eintritt erleichtern könnte, durchgeführt. Erste Ergebnisse unterstützen die Annahme einer Umstrukturierung von Tight Junctions durch *Staphylococcus aureus*, einen offensichtlichen Link zum verbesserten HSV-1-Eintritt gab es allerdings nicht.